

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Pequenos RNAs não codificantes em bactérias do complexo
Burkholderia cepacia: contribuição para a sua identificação e
caracterização do seu papel na virulência**

Paulo Jorge Gomes Pereira da Costa

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Pequenos RNAs não codificantes em bactérias do complexo
Burkholderia cepacia: contribuição para a sua identificação e
caracterização do seu papel na virulência**

Paulo Jorge Gomes Pereira da Costa

Dissertação orientada por:

Orientador externo - Professor Doutor Jorge Humberto Gomes Leitão

Orientador interno - Professora Doutora Deodália Maria Antunes Dias

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2011

AGRADECIMENTOS:

Na elaboração deste trabalho foram várias as pessoas que me ajudaram, de diversas maneiras, na concretização do mesmo, e às quais quero deixar um agradecimento.

Ao meu orientador, Professor Doutor Jorge Leitão pela disponibilidade, preocupação com a realização do meu trabalho e, principalmente, pelos conselhos e críticas que me motivaram a fazer mais e melhor.

À Professora Doutora Deodália Dias, professora e coordenadora do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, por ter aceitado ser co-orientadora desta dissertação, pela disponibilidade, simpatia e saber que demonstrou sempre que precisei de ajuda e aconselhamento.

Aos meus colegas de laboratório, em especial ao estudante de Doutoramento Christian Ramos, Doutora Sílvia Sousa, à Joana e ao André, que me ajudaram sempre que necessitei, sugerindo e esclarecendo as dúvidas que foram surgindo ao longo deste trabalho, demonstrando grande disponibilidade e criando bom ambiente de trabalho.

À Professora Doutora Isabel Sá-Correia, responsável do grupo de investigação das ciências biológicas, do Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, sediado no Instituto Superior Técnico, por me ter acolhido.

À minha namorada e amigos, pelo companheirismo e motivação e alegria que sempre partilharam comigo, estando sempre presentes nos momentos bons e maus.

Por fim, e de forma muito especial, quero agradecer aos meus pais e irmão, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, acompanhando e incentivando em qualquer circunstância, com certeza sem eles a realização e conclusão desta etapa não teria sido possível. Muito Obrigado.

RESUMO

Nos últimos anos, um número crescente de trabalhos tem evidenciado que os pequenos RNAs reguladores não-codificantes (sRNAs) desempenham um papel basilar na regulação da expressão pós-transcricional de vários genes em procariontes. Entre esses genes, assumem particular importância aqueles cujos produtos constituem factores de virulência e de resposta a stresses vários. Os sRNAs permanecem praticamente desconhecidos no Complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc). O Bcc compreende pelo menos dezassete espécies patogénicas oportunistas geneticamente próximas, capazes de causar infecções, particularmente graves em doentes com fibrose quística, em doentes imunocomprometidos e em doentes hospitalizados.

O uso do nemátodo *Caenorhabditis elegans* como modelo de infecção permitiu identificar um mutante de *B. cepacia* IST408 cuja virulência foi severamente reduzida, devido à interrupção dum gene codificante para uma proteína 84% similar à chaperona de pequenos RNAs de *Escherichia coli*, a proteína Hfq.

A conhecida interacção entre a proteína do Hfq2 e sRNAs potencia o interesse do uso desta proteína como ferramenta para o isolamento de sRNAs através de técnicas de co-purificação.

Neste contexto, o presente trabalho contribuiu para a identificação e caracterização do papel de um sRNA, denominado mtvR, envolvido na virulência de *Burkholderia cenocepacia* J2315.

PALAVRAS-CHAVE

Pequenos RNAs reguladores não codificantes, Complexo *Burkholderia cepacia*, *Caenorhabditis elegans*, Chaperona de RNA Hfq2, regulação pós-transcricional, sRNA mtvR

ABSTRACT

Over the last years, increasing evidence has shown that small non-coding regulatory RNAs (sRNAs) play a critical role in the post-transcriptional regulation of gene expression in prokaryotes. Among genes recognized to be subject to post-transcriptional regulation, particular attention has been given to those encoding determinants of virulence and resistance to various stresses. The roles played by sRNAs remain unknown in bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). The Bcc includes opportunistic pathogens that belong to at least seventeen closely related species, able to cause severe and often lethal infections, particularly among cystic fibrosis patients, immunocompromised patients and hospitalized patients.

Previous work from the IST research team led to the identification of a gene encoding a protein 84% similar to the *Escherichia coli* RNA chaperone Hfq.

In the present work we have exploited the known interaction between Hfq2 and sRNAs in co-purification experiments, envisaging the identification of sRNAs from Bcc.

In this context, this program contributed to the identification and characterization of the sRNA mtvR. This sRNA plays a role in the virulence of *Burkholderia cenocepacia* J2315, as demonstrated by experiments using the nematode *Caenorhabditis elegans* as an infection model.

KEYWORDS

Small non-coding regulatory RNAs, *Burkholderia cepacia* complex, *Caenorhabditis elegans*, RNA chaperone Hfq2, post-transcriptional regulation, mtvR sRNA

INDICE

| | |
|---|----|
| AGRADECIMENTOS | 1 |
| RESUMO | 2 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1. Objectivos | 6 |
| 2. Introdução | 7 |
| 2.1. O Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> | 7 |
| 2.2. <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 | 8 |
| 2.3. Virulência do Bcc | 11 |
| 2.4. Proteínas Hfq e Hfq2 | 13 |
| 2.5. Regulação génica por sRNAs | 15 |
| 2.5.1. sRNAs e o Bcc | 15 |
| 2.5.2. Classes de sRNAs | 17 |
| 2.5.3. sRNAs caracterizados | 18 |
| 3. Materiais e Métodos | 20 |
| 3.1. Estirpes e condições da cultura | 20 |
| 3.2. Extração e Purificação | 20 |
| 3.3. Co-Purificação com Hfq2 | 20 |
| 3.4. Conversão dos sRNAs a cDNA | 21 |
| 3.5. Clonagem do cDNA e triagem por PCR | 21 |
| 3.6. RFLP e sequenciação | 22 |
| 3.7. Sequenciação, mapeamento génico e modelação estrutural | 22 |
| 3.7.1. VecScreen | 22 |
| 3.7.2. BLAST (NCBI) | 23 |
| 3.7.3. Sistema IMG (Integrated Microbial Genomes) | 23 |
| 3.7.4. Mapeamento dos sRNAs (sRNAMap) | 24 |
| 3.7.5. Previsão dos alvos | 24 |
| 3.7.6. Previsão de estrutura secundária | 24 |
| 3.7.7. Relações evolucionárias | 25 |
| 3.8. Construção de plasmídeos | 25 |
| 3.9. Electrotransformação | |

| | |
|--|-----------|
| 3.10. Infecção do Nemátodo <i>Caenorhabditis elegans</i> | 26 |
| 4. Resultados e Discussão | 27 |
| 4.1. RFLP | 27 |
| 4.2. Sequenciação | 29 |
| 4.3. Análise Bioinformática | 29 |
| 4.3.1. BLAST N e IMG | 29 |
| 4.3.2. Identificação de sRNAs | 31 |
| 4.3.3. Previsão dos alvos dos sRNAs | 33 |
| 4.3.4. Previsão da estrutura secundária | 35 |
| 4.3.5. Ensaio de virulência | 36 |
| 5. Discussão final | 39 |
| 6. Conclusão e Perspectivas futuras | 41 |
| 7. Bibliografia | 43 |

1. Objectivos

Este trabalho teve como principal objectivo contribuir para a identificação e caracterização de pequeno(s) RNA(s) da bactéria *Burkholderia cenocepacia* J2315, determinante(s) para a sua virulência. Esta estirpe bacteriana é um patogénico oportunista humano particularmente virulento, tendo sido isolado de um doente com Fibrose Quística (FQ).

Com este trabalho pretendeu-se também contribuir para o conhecimento dos alvos do(s) sRNA(s), o seu mecanismo de acção, bem como do seu efeito a nível celular e molecular e o seu envolvimento na virulência desta estirpe particularmente virulenta pertencente ao complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc).

Para atingir os objectivos anteriores efectuaram-se testes de virulência, usando como modelo de infecção o nemátodo *C. elegans*.

Estes testes foram conduzidos em culturas de *B. cenocepacia* J2315 em que o sRNA *mtvR* foi sobreexpresso ou silenciado. O sRNA *mtvR* foi seleccionado por análise bioinformática das sequências obtidas após isolamento de RNAs por co-purificação com a proteína Hfq2 de *Burkholderia cenocepacia* J2315, seguida de clonagem e sequenciação.

2. Introdução

2.1. O Complexo *Burkholderia cepacia*

O elevado número de estudos realizados nos últimos anos sobre as bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) foi despoletado pela sua emergência como patogénicos oportunistas muito problemáticos em doentes com fibrose quística (FQ). A FQ é uma doença genética hereditária que, entre outras manifestações clínicas, predispõe a infecções respiratórias graves, recorrentes e por vezes letais (Lyczak *et al.*, 2002; Mahenthiralingam *et al.*, 2005).

Nos anos 50 do séc. XX, foi descrita a primeira espécie deste grupo tendo sido denominada *Pseudomonas cepacia* por Burkholder (1950). A espécie foi identificada como causadora de podridão em cebolas (Burkholder, 1950). Em 1992, foi criado o género *Burkholderia* no qual se inseriram sete espécies que até aí se encontravam inseridas no género *Pseudomonas* (Yabuuchi *et al.*, 1992).

O complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) constitui um grupo de pelo menos 17 espécies estreitamente relacionadas, capazes de causar infecções letais em indivíduos imunocomprometidos, sendo comum em doentes com fibrose quística (FQ), a doença hereditária genética mais frequente em caucasianos (Govan *et al.*, 2007; Vanlaere *et al.*, 2008; Vanlaere *et al.*, 2009).

A fibrose quística é uma doença causada por uma mutação no gene *CFTR* (Cystic fibrosis transmembranase regulator) situado no cromossoma 7, que codifica a proteína responsável pelos canais de iões cloreto nas membranas de células epiteliais, afectando aproximadamente 1 em cada 2500 nados vivos. É a doença hereditária mais comum entre os caucasianos, com 1 em cada 25 indivíduos portadores de uma cópia defeituosa do gene. A doença tem carácter recessivo, manifestando-se apenas quando a mutação ocorre em ambos os alelos do gene. A FQ resulta de mudanças patológicas em órgãos que expressam o gene *CFTR*, por exemplo o pâncreas, fígado, sistema reprodutivo e pulmões. É ao nível pulmonar que se observam as manifestações mais graves da doença, observando-se um aumento da viscosidade do muco

que prejudica a limpeza mucociliar dos pulmões, causada por um aumento da perda de água devido à deficiência no transporte de cloreto (Govan & Deretic, 1996; Ratjen & Döring, 2003).

A patofisiologia da doença predispõe ao aparecimento de infecções e inflamações pulmonares, existindo vários graus de severidade associados às mutações específicas no *CFTR*. As manifestações pulmonares da doença constituem a principal causa de morbilidade e mortalidade em doentes com FQ (Ratjen & Döring, 2003).

Apesar de originalmente as bactérias do Bcc serem isoladas a partir de doentes com FQ, elas também são responsáveis por infecções em outros doentes imunocomprometidos, tendo sido reportados casos de infecção em pacientes com Doença granulomatosa crónica (CGD), cancro e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e até em indivíduos imunocompetentes (Sousa *et al.*, 2011).

As infecções pelo Bcc são particularmente importantes por serem associadas à ausência de um padrão único da sua evolução clínica, variando desde o porte assintomático até ao chamado “síndrome da cepacia”, uma pneumonia necrotizante rápida e fatal, podendo levar à morte do paciente num período de tempo de menos de uma semana (Isles *et al.*, 1984).

Um factor relevante para o estudo do Bcc prende-se com a elevada dificuldade, e por vezes impossibilidade de erradicação das infecções, devido à sua resistência intrínseca à maioria dos antibióticos clinicamente disponíveis. Em Portugal, um estudo sobre a caracterização da resistência a antimicrobianos mostrou que 55% dos isolados pertencentes ao Bcc em doentes com FQ eram multirresistentes (MR) (Leitão *et al.*, 2008).

2.2. *Burkholderia cenocepacia* J2315

A estirpe J2315 de *B. cenocepacia* usada no presente estudo, pertence ao grupo das bactérias com o seu genoma sequenciado. Em Janeiro de 2010 existiam disponíveis publicamente as sequências nucleotídicas completas dos genomas de 9 estirpes pertencentes a 4 espécies do Bcc. O genoma destas estirpes está organizado em três cromossomas e algumas contêm plasmídeos. O tamanho do genoma destas bactérias varia entre 6,2 Mega pares de base

(Mbp) e 8,7 Mbp (Tabela 1). A estirpe *B. cenocepacia* J2315, também conhecida como a estirpe de Edimburgo-Toronto, esteve envolvida na morte de vários doentes com FQ, sendo das estirpes mais virulentas do Bcc. Possui três cromossomas circulares e um plasmídeo, que codificam para além de funções metabólicas e de transporte, vários factores de virulência e determinantes de resistência a drogas. O interesse nesta estirpe deve-se às características apresentadas, à sua elevada prevalência mundial e ao elevado número de ilhas genómicas reveladoras da elevada plasticidade genómica e versatilidade metabólica destes microrganismos (Holden *et al.*, 2009).

Tabela 1- Características genómicas das estirpes do Bcc cujos genomas se encontram completamente sequenciados e de acesso público (adaptado de Leitão *et al.*, 2010).

| Espécie/Estirpe | Tamanho do genoma (nt) | Replicões | Genes que codificam proteínas | G+C (%) |
|----------------------------------|------------------------|-----------|-------------------------------|---------|
| <i>B. ambifaria</i> MC40-6 | 7642536 | 3 Chr+1 p | 6878 | 66.4 |
| <i>B. cenocepacia</i> J2315 | 8055782 | 3 Chr+1 p | 7229 | 66.9 |
| <i>B. dolosa</i> AUO158 | 6247594 | NA | 5441 | 66.8 |
| <i>B. lata</i> 383 | 8676277 | 3 Chr+1 p | 7725 | 66.8 |
| <i>B. multivorans</i> ATCC 17616 | 7008622 | 3 Chr+1 p | 6290 | 66.7 |
| <i>B. ubonensis</i> Bu | 6932532 | NA | 7192 | 67.3 |
| <i>B. vietnamiensis</i> G4 | 8391070 | 3 Chr+5 p | 7775 | 65.7 |

Legenda: Chr cromossomas, p plasmídeo, nt nucleótidos, NA informação não disponível

A espécie *B. cenocepacia* é caracterizada por uma maior prevalência, em estudos realizados em populações de doentes com FQ a nível mundial (LiPuma *et al.*, 2001; Mahenthiralingam *et al.*, 2001). A elevada prevalência em doentes com FQ da espécie *B. cenocepacia* é uma característica partilhada com a espécie *B. multivorans*, que juntas são responsáveis por 84-97% das infecções pelo Bcc em doentes com FQ nos vários estudos realizados (Tabela 2) (Drevinek & Mahenthiralingam, 2010). Conforme se pode observar na Tabela 2, Portugal representa uma excepção a essa elevada predominância pois no estudo de Cunha *et al.*, 2003, observou-se um elevado número de infecções

por *Burkholderia cepacia* (36%) nos pacientes do centro de FQ do Hospital de Santa Maria (HSM) entre 1995-2002 (Cunha *et al.*, 2003).

Esta representação excepcionalmente elevada de *Burkholderia cepacia* em Portugal foi confirmada num estudo posterior de Cunha *et al.* (2007), em que 85% dos pacientes com FQ infectados com bactérias do Bcc possuíam os isolados desta espécie. Este estudo também sugere que o facto de soluções salinas não-estéreis para uso nasal estarem intrinsecamente contaminadas com duas estirpes de *B. cepacia* também presentes em infecções de doentes com FQ, pode estar relacionado com o excepcionalmente elevado número de infecções desta espécie, embora uma ligação inequívoca tenha sido impossível de determinar (Cunha *et al.*, 2007).

Tabela 2- Proporção da distribuição das infecções pelo Bcc em populações seleccionadas de pacientes com FQ (Adaptado de Drevinek & Mahenthiralingam, 2010).

| Espécies do Bcc | USA | Canada | França | República Checa | Itália | Portugal |
|--|------------|---------------|---------------|------------------------|---------------|-----------------|
| <i>Burkholderia cenocepacia</i> | 45.6 | 80 | 45.1 | 91.8 | 86.8 | 52.2 |
| <i>Burkholderia multivorans</i> | 38.7 | 9.3 | 51.6 | 4.9 | 0.0 | 9.0 |
| Outras espécies | 14.4 | 8.9 | 3.3 | 1.7 | 13.2 | 38.8 |
| Indeterminados | 1.3 | 1.8 | 0.0 | 1.6 | 0.0 | 0.0 |

O estudo filogenético das bactérias do Bcc tem contribuído para um estudo epidemiológico mais aprofundado das bactérias deste complexo. A análise da sequência do gene *recA*, que codifica uma proteína essencial para a reparação e recombinação do DNA, permitiu dividir a espécie *B. cenocepacia* em 4 grupos em que a linhagem ET-12 à qual pertence *Burkholderia cenocepacia* J2315 foi responsável por infecções em doentes com FQ no Canadá, Reino Unido e outros países Europeus (Drevinek & Mahenthiralingam, 2010; Mahenthiralingam *et al.*, 2005).

Um estudo de Baldwin *et al.* (2008) apresentou uma nova técnica de tipagem, a tipagem por sequenciação de múltiplos loci (MLST). Esta consiste

na comparação das sequências nucleotídicas de sete genes constitutivos (housekeeping), em que cada estirpe é caracterizada pelo tipo de sequência (ST) e um número arbitrário que representa essa combinação única dessas sete sequências alélicas. Nesta nova técnica de tipagem a linhagem ET-12 corresponde a pelo menos cinco STs, apresentando apenas o ST-28 propagação intercontinental (Baldwin *et al.*, 2008; Devrinek & Mahenthiralingam, 2010).

2.3. Virulência do Bcc

A infecção do sistema respiratório está dependente da capacidade das bactérias aderirem às superfícies mucosas ou epiteliais do hospedeiro, que no caso do pulmão dos pacientes com FQ possui uma camada mucosa mais espessa, que juntamente com uma deficiente limpeza mucociliar, reduzida eficácia dos péptidos antimicrobianos e uma resposta inflamatória aumentada, criam um ambiente propício a infecções (Boucher, 2007).

Apesar da predisposição a infecções em doentes com FQ, a aparentemente exclusiva capacidade das bactérias do Bcc para causar bacterémia tem particular interesse. Deste modo o estudo dos factores de virulência para elucidar a patogenicidade destes agentes bacterianos tem assumido particular importância (Leitão *et al.*, 2010).

Muitos factores de virulência do Bcc já se encontram descritos (revisto em Sousa *et al.*, 2011), tais como os sistemas de quorum-sensing (QS), produção de biofilmes, ilhas genómicas, produção de exopolissacáridos (EPS) e a multirresistência a antibióticos, para enumerar alguns dos mais estudados (revisto em Sousa *et al.*, 2011; Loulet & Valvano, 2010).

O sistema de QS do Bcc denomina-se CepIR, que arma as bactérias com um mecanismo de resposta rápida a alterações ambientais, sendo responsável pela regulação de outros factores de virulência como toxinas, proteases, lipase, sideróforos e formação de biofilmes (revisto em Venturi *et al.*, 2004). Este mecanismo permite a regulação da expressão génica baseada na densidade da população bacteriana, devido à acumulação extracelular de compostos secretados pelas bactérias (neste caso homoserina lactonas), em

que atingida uma determinada concentração é alterada a expressão génica de toda a população de forma coordenada (Fuqua *et al.*, 1996).

Os biofilmes são comunidades bacterianas em que cada bactéria vive num estilo de vida sésil, protegidas das agressões do meio ambiente e do ataque das defesas do hospedeiro. Quando em biofilmes as bactérias do Bcc demonstraram ser mais resistentes a antibióticos do que as células planctónicas, contribuindo para a sua persistência em doentes com FQ. (Caraher *et al.*, 2007).

As ilhas genómicas contribuem para a elevada plasticidade e diversidade metabólica das bactérias do Bcc, sendo adquiridos por transferência génica horizontal. Várias evidências apontam para que estas representem mais de 10% do genoma em algumas espécies do Bcc. A aquisição destas ilhas genómicas parece desempenhar um papel importante na evolução de linhagens epidémicas, introduzindo funções novas que promovem a sobrevivência e patogénese da bactéria no pulmão com FQ (Sousa *et al.*, 2011).

A produção de exopolissacáridos (EPS) é muito variável e mesmo estirpes virulentas como *B. cenocepacia* J2315 produzem poucos ou nenhuns EPS. Contudo um EPS específico denominado “cepaciano” demonstrou interferir com a fagocitose das bactérias por neutrófilos, inibindo a quimiotaxia dos neutrófilos e a produção de espécies reactivas de oxigénio (Sousa *et al.*, 2011)

Um factor relevante para a dificuldade no combate às infecções pelo Bcc é a sua intrínseca multirresistência a antibióticos. Esta é o resultado da acção das várias bombas de efluxo que removem de modo eficiente os antibióticos da célula, da formação de biofilmes que diminuem o contacto entre a superfície celular e os antibióticos, e de alterações no envelope celular que diminuem a permeabilidade da membrana aos antibióticos (George *et al.*, 2009).

Para testar a virulência do Bcc têm sido utilizados vários modelos de infecção, incluindo mamíferos, peixes, nemátodos, insectos, protozoários e plantas. Com a excepção dos mamíferos que constituem os modelos mais utilizados, nenhum dos outros possui imunidade adaptativa. Este é o caso do modelo utilizado neste estudo, o nemátodo *Caenorhabditis elegans*, que apenas possui imunidade inata para combater infecções. Um dos principais

problemas da utilização de modelos de infecção é que alguns factores de virulência não são universais, sendo específicos do hospedeiro utilizado como modelo de infecção, como foi observado aquando da utilização de um sistema de teste de patogenicidade com hospedeiros múltiplos (Leitão *et al.*, 2010; Loulet *et al.*, 2010; Uehlinger *et al.*, 2009).

2.4. Proteínas Hfq e Hfq2

As características das bactérias do Bcc levaram a vários estudos sobre a sua virulência e resistência a vários tipos de stress. Num desses estudos, Sousa *et al.* (2010) identificaram um mutante de *B. cepacia* IST408 susceptível às condições de stress semelhantes às enfrentadas pela bactéria quando infecta o hospedeiro com FQ (Sousa *et al.*, 2010).

Este mutante continha uma inserção na região promotora de um gene homólogo ao gene *hfq* de *Escherichia coli* que codifica uma proteína de 102 aminoácidos. A proteína Hfq foi inicialmente identificada como um factor do hospedeiro para a replicação do RNA do bacteriófago Q β (Franze de Fernandez *et al.*, 1968). O interesse nesta proteína deriva da multiplicidade de fenótipos observados por mutações no gene que a codifica, incluindo uma diminuição da taxa de crescimento, um aumento da susceptibilidade aos raios ultravioleta (UV) e a agentes oxidantes (Tsui *et al.*, 1004).

A importância desta proteína é atestada pela sua conservação entre diferentes espécies, sendo identificada como um importante factor de virulência entre bactérias Gram-negativas, tais como *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brucella abortus* e *Neisseria meningitidis*, entre outras (Fantappiè *et al.*, 2009; Nakao *et al.*, 1995; Robertson & Roop, 1999; Sittka *et al.*, 2007; Sonnleitner *et al.*, 2003).

Em *E. coli*, foi demonstrada a participação da proteína Hfq na riborregulação de RNAs mensageiros (mRNAs) através de pequenos RNAs não codificantes (sRNAs), auxiliando a sua interacção e actuando, deste modo, como chaperona de RNAs (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Testes efectuados *in vitro* em *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Burkholderia cepacia* indicam que a proteína Hfq forma hexameros, ligando RNAs de modo circular à volta do poro central do hexamero. Pensa-se que este será o mecanismo pelo qual a Hfq

modula a estrutura do RNA e promove a interacção entre os sRNAs e os mRNAs-alvo (Sauter *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2010; Valentin-Hansen, 2004).

Uma chaperona de RNA é uma proteína que se liga transitória e não-especificamente ao RNA e ajuda as moléculas de RNA a entrarem nas suas conformações nativas (funcionais), prevenindo e/ou resolvendo conformações não-funcionais. Esta interacção é necessária para converter o RNA na sua conformação funcional mas não para manter essa reestruturação. A interacção não requer a hidrólise de ATP para a sua actividade (Rajkowisch *et al.*, 2007a; Rajkowisch *et al.*, 2007b). Na última década, a proteína Hfq começou a ser reconhecida como uma peça-chave na regulação por sRNAs, sendo essa função a mais estudada actualmente. A interacção Hfq-sRNA actua maioritariamente como repressora da tradução e/ou aceleradora do decaimento do mRNA alvo, embora também possa estabilizar ou promover a tradução de mRNAs (Chao & Vogel, 2010).

O envolvimento da Hfq no controlo da tradução do mRNA implica que a proteína desempenhe vários papéis na regulação em patogéneos gram-negativos e gram-positivos, entre os quais se incluem o controlo da produção de toxinas, reguladores de QS, formação de biofilmes, entre outras (Chao & Vogel, 2010).

Sousa *et al.* (2010), para além da análise funcional da proteína Hfq de *B. cepacia* de 79 aminoácidos, homóloga à existente em *E. coli*, identificou também uma segunda chaperona de RNA que foi denominada Hfq2 composta por 188 aminoácidos. As bactérias do Bcc estão entre um pequeno número de procariotas que contêm no seu genoma dois genes codificando duas proteínas do tipo Hfq. Para além de algumas espécies do género *Burkholderia*, incluindo todas as do Bcc, esta característica é partilhada com as espécies *Methanobacterium thermautrophicum*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Bacillus anthracis*, *Magnetospirillum magnetotacticum* e *Novosphingobium aromaticivorans*. (Salgado-Garrido *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2010).

Resultados recentes demonstraram que as duas proteínas tipo Hfq são necessárias e contribuem para a sobrevivência a stresses semelhantes aos encontrados no hospedeiro com FQ (Sousa *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2011b).

Os estudos efectuados com as duas proteínas mostram um padrão de regulação distinto, com os níveis máximos de RNA do *hfq* a serem atingidos no

início da fase exponencial de crescimento enquanto os níveis máximos de *hfq2* foram atingidos na fase estacionária. Observou-se também que o QS desempenha um papel na regulação da expressão do gene *hfq2*, permitindo a sua máxima expressão quando os níveis de RNA de *hfq* são mínimos. Apesar de aparentemente desempenharem os mesmos papéis na fisiologia celular, as proteínas Hfq e Hfq2 devem ter funções distintas, sendo disso exemplo o aumento da resistência a altas temperaturas e baixo pH na sobreexpressão da Hfq enquanto, a sobreexpressão da Hfq2 aumenta a resistência aos stresses osmótico e oxidativo (Ramos *et al.* 2011b).

Quanto à virulência o mesmo estudo mostra uma maior mortalidade do modelo de infecção *C. elegans* na sobreexpressão da Hfq2, enquanto a sobreexpressão da Hfq leva a um aumento de CFU's das bactérias no tracto digestivo deste modelo de infecção, demonstrando que apesar de terem funções parcialmente diferentes, as duas são necessárias para a virulência destas bactérias (Ramos *et al.* 2011b).

2.5. Regulação génica por sRNAs

2.5.1. sRNAs e o Bcc

Os sRNAs são moléculas de RNA que nos últimos anos têm evidenciado um papel importante na regulação de respostas adaptativas a nível pós-transcricional. Os sRNAs são tipicamente codificados em regiões intergénicas (IG) possuindo tipicamente entre 50 a 500 nucleótidos (nt), muitos deles conservados, exercendo a denominada regulação em *trans*. Contudo, estudos recentes têm demonstrado a importância da regulação exercida por sRNAs codificados dentro de grelhas de leitura aberta (ORFs), os sRNAs que actuam em *cis* (Ramos *et al.*, 2010a; Sharma *et al.*, 2010).

Cerca de 140 sRNAs bacterianos foram descobertos nos últimos anos. A maior parte destes sRNAs foram descobertos em *E. coli*, e uma pequena parte foi caracterizado noutras bactérias, muitas delas patogénicas. Muitos destes genes foram identificados como resultado de triagens sistemáticas usando algoritmos computacionais desenhados especificamente para prever sRNAs.

Outros foram identificados por abordagens experimentais recorrendo à sequenciação em larga escala (Gottesman, 2005).

A expressão de muitos destes genes depende da fase de crescimento ou está relacionada com a exposição a stresses específicos. Devido ao facto de cada pesquisa para possíveis sRNAs possuir parâmetros específicos, têm sido identificados genes com características distintas. Consequentemente, sRNAs únicos como os que são específicos de determinada espécie, podem escapar a estas análises (Altuvia, 2007).

Estudos sobre os sRNAs têm demonstrado que estes são mais abundantes e importantes do que inicialmente se previra, pois desempenham um papel importante em vários processos celulares, onde se incluem a regulação transcricional, a replicação cromossómica, o processamento e modificação do RNA, a estabilidade e tradução de RNAs mensageiros (mRNAs), a degradação, translocação e inibição proteica, a homeostase do ferro, o metabolismo de açúcares, a regulação por quorum sensing, a sobrevivência na fase estacionária e a regulação da virulência em bactérias patogénicas (Ramos *et al.*, 2010a; Man *et al.*, 2011).

Dada a descoberta de sRNAs de função desconhecida, a identificação dos seus alvos celulares tornou-se urgente. Apesar da maior parte dos estudos de sRNAs terem sido efectuados nos modelos *E. coli* ou *Salmonella*, um estudo efectuado na estirpe virulenta do Bcc, *Burkholderia cenocepacia* J2315, previu *in silico*, a existência de duzentos e treze supostos sRNAs, tendo sido confirmada a expressão de quatro deles por análise de *microarrays* embora os suas funções biológicas permaneçam desconhecidas (Coenye *et al.*, 2007).

A maior parte dos sRNAs transcritos têm uma marcada estrutura secundária que facilita interacções com outras moléculas. Muitos destes sRNAs previstos parecem estar relacionados com os RNAs não codificantes (ncRNAs) previamente caracterizados envolvidos na regulação de vários processos celulares, embora muitos ainda sejam de função desconhecida (Coenye *et al.*, 2007; Peeters *et al.* 2010).

A previsão de sRNAs *in silico* é uma metodologia que apesar de produzir resultados, requer muito cuidado na sua análise, uma vez que ao basear-se em comparação bioinformática das regiões intergénicas, requer sempre validação

in vivo ou *in vitro* e não abrange os possíveis sRNAs que estão codificados na cadeia oposta ao mRNA com que interage (Coenye *et al.* 2007).

2.5.2. Classes de sRNAs

Os sRNAs podem ser classificados em várias classes. A classe mais estudada de sRNAs actua por emparelhamento parcial de bases com mRNAs alvo, modulando normalmente a tradução e estabilidade de mRNAs, estando a sua maioria envolvida na regulação das respostas a mudanças das condições ambientais. Os riboswitches fazem parte da região 5' não traduzida (UTR) do mRNA que regulam. Estas sequências possuem estruturas susceptíveis a mudanças conformacionais através da ligação a pequenas moléculas, respondendo às alterações de vários nutrientes nas células (Waters & Storz, 2009).

Um grupo de reguladores de RNA recentemente descobertos e conhecidos por CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), contêm pequenas regiões homólogas com sequências de plasmídeos e bacteriófagos, interferindo na infecção por bacteriófagos e conjugação plasmídica, funcionando assim como um análogo bacteriano aos sistemas imunitários (Waters & Storz, 2009).

Os sRNAs que actuam por mecanismos de emparelhamento de bases podem ser codificados na cadeia de DNA oposta à que codifica o seu mRNA alvo (cis-encoded) ou em *loci* fisicamente separados e/ou distantes da ORF que codifica o seu mRNA alvo (trans-encoded). Estes últimos actuam geralmente por um pequeno e imperfeito emparelhamento (mínimo de 7 nucleótidos) com o mRNA alvo, requerendo muitas vezes a acção da chaperona de RNA Hfq. Os sRNAs seleccionados podem ser explorados como novos alvos terapêuticos ou como agentes inibidores do crescimento bacteriano, de maneira a tratar e prevenir doenças infecciosas, principalmente quando a eficácia dos antibióticos de uso clínico é baixa (Papenfort & Vogel, 2010).

2.5.3. sRNAs caracterizados

A maior parte dos sRNAs codificados em *trans* como DicF, MicF, OxyS, Spot42, RyhB e GcvB silenciam os seus mRNAs-alvo envolvendo a proteína Hfq. Esta providencia um aumento da estabilidade dos sRNAs, protegendo-os da degradação. Esta associação com a Hfq é importante pois é conhecida a sua interacção com proteínas como a poli (A) polimerase I (PAP I), a polinucleótido fosforilase (PNP) e a Ribonuclease E (RNase E), que estão envolvidas no decaimento de mRNA. É de particular relevância o facto da RNase E ser a endorribonuclease maioritária que participa no *turnover* do RNA em *E. coli*, iniciando a sua degradação por hidrólise interna perto da extremidade 5'. Alguns sRNAs em *E. coli* formam um complexo ribonucleoproteico com a RNase E e a Hfq, que resulta na inibição da tradução por degradação do mRNA alvo pela RNase E (Man *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, vários sRNAs têm vindo a ser identificados e caracterizados, exibindo funções muito variadas em diversos mecanismos celulares/moleculares (Papenfort & Vogel, 2010; Gottesman & Storz, 2010).

Um dos mecanismos de regulação por sRNAs mais estudado é a regulação de um importante factor de transcrição de genes de resposta a stress, o RpoS (Repoila *et al.* 2003). Vários trabalhos mostraram que a regulação do RpoS requer a intervenção da proteína Hfq (Brown & Elliott 1996; Sledjeski *et al.*, 2001; Muffler *et al.*, 1996).

Os sRNAs DsrA, RprA e ArcZ adquirem a sua conformação funcional com a ajuda da proteína Hfq, libertando a região “leader” do RpoS da sua auto-repressão (Figura 1). Cada um destes sRNAs é expresso sob condições de stress diferentes. No entanto, a expressão do RpoS ocorre em resposta a uma grande variedade de stresses, tendo sido demonstrado que a Hfq actua como estabilizadora dos complexos sRNA-RpoS (Soper *et al.*, 2010).

Ultimamente têm sido descritos vários exemplos em que os sRNAs se tornaram os elos que faltavam para ligar os complexos circuitos de regulação da expressão génica. Um exemplo destes mecanismos de regulação é o sRNA RybB, que inibe a síntese de proteínas da membrana externa (OMP), tendo sido usado como ferramenta para estudar mecanismos de resposta a stress (Papenfort & Vogel, 2009).

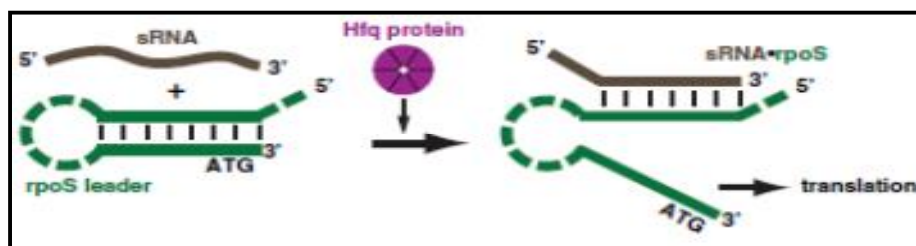


Figura 1- Mecanismo de regulação por sRNAs do RpoS (adaptado de Soper *et al.*, 2010).

A existência de um grande número de genes de sRNAs no genoma de *B. cenocepacia* J2315 pode ajudar a explicar a complexidade, variabilidade fenotípica, elevada versatilidade metabólica e capacidade para sobreviver numa grande diversidade de ambientes (Kawano *et al.*, 2005).

Para identificar um novo sRNA podem usar-se várias estratégias. No presente trabalho, para obter sRNAs de *B. cenocepacia* J2315 usou-se a proteína Hfq2, que como chaperona de RNA é capaz de interagir com sRNAs, através de técnicas de co-purificação como descrito anteriormente (Ramos *et al.*, 2011a). A proteína recombinante Hfq2 contendo 6-histidinas na sua região N-terminal foi produzida e purificada. O RNA total foi extraído de *B. cenocepacia* J2315 e enriquecido em RNAs de pequeno tamanho usando um kit comercial. Juntaram-se as fracções enriquecidas em sRNAs à proteína Hfq2 purificada e os complexos formados foram misturados com esferas magnéticas contendo anticorpos específicos para a cauda de histidinas da proteína Hfq2.

Todos os complexos foram recuperados e as moléculas de RNA que não estavam fortemente agarradas à proteína foram removidas por lavagem com uma solução adequada. As moléculas de sRNA ligadas à Hfq2 foram purificadas e convertidas em moléculas de cDNA, para permitir a clonagem e sequenciação. As moléculas de cDNA foram ainda concatemerizadas e os fragmentos resultantes ligados a um vector de clonagem, de modo a serem posteriormente sequenciadas.

As sequências nucleotídicas foram analisadas bioinformaticamente, tendo-se escolhido o sRNA mtvR para mais estudos durante o presente trabalho.

3. Materiais e Métodos:

3.1. Estirpes e condições da cultura

No presente trabalho usou-se a estirpe altamente virulenta *Burkholderia cenocepacia* J2315. Esta estirpe foi cultivada a 37°C em placas de Pseudomonas Isolation Agar (PIA). As culturas em meio líquido foram efectuadas em meio Lennox broth (LB) a 37 °C durante 24 horas com agitação orbital (250 rpm). Após as 24h, alíquotou-se 1ml de cada cultura, recolhendo-se as células por centrifugação, sendo posteriormente guardadas e mantidas a 4°C como suspensões em solução tampão RNA later Solution até serem processadas.

3.2. Extracção, purificação e quantificação do RNA

O RNA total foi extraído das células de *B. cenocepacia* usando o kit comercial mirVana (Ambion), tendo-se procedido de seguida a uma extracção com fenol/clorofórmio. O enriquecimento em sRNAs foi obtido por ajuste da concentração de etanol durante a ligação do RNA à fibra de vidro. A concentração de RNA total nas amostras purificadas foi estimada usando um espectrofotómetro Nanodrop 1000 UV. Amostras que apresentaram uma razão A_{260} / A_{280} inferiores a 1.9 foram descartadas. A quantidade de RNA extraído foi analisada em gel desnaturante (7M ureia) de poliacrilamida (15%), para aferir a sua qualidade através de inspecção visual das bandas no gel, após electroforese a 450 V em TBE 1X.

3.3. Co-purificação com Hfq2

A proteína Hfq2 foi sobreexpressa como proteína recombinada contendo 6 histidinas adicionais na região C-terminal, em células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo Hfq2–6His. Após a sua purificação por cromatografia de afinidade, a proteína foi dialisada contra Hfq storage buffer,

como descrito anteriormente (Ramos *et al.* 2011a). Alíquotas contendo 100nM de Hfq2 foram incubadas com 1 µg de sRNA a 25°C durante 1 hora.

Os complexos Hfq2-sRNA foram misturados com 150 µl de esferas magnéticas de agarose contendo Ni-NTA (Qiagen). Os complexos Ni-NTA-Hfq-sRNA foram lavados com tampão fosfato 50 mM com 0,05% de Tween 20 e 20 mM de imidazole e posteriormente com tampão de lavagem contendo 200mM imidazole. Os complexos Hfq2-sRNA foram eluídos com fosfato 150 mM contendo 500mM NaCl e 300mM imidazole. Seguidamente os sRNA foram separados por extracção com fenol/clorofórmio, precipitados em etanol e ressuspensos em 20 µl de água de elevado grau de pureza (MP Biomedicals).

3.4. Conversão dos sRNAs a cDNA

Os procedimentos de clonagem foram baseados em métodos previamente descritos (Kawano *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2001), usando o adaptador 5' 5EAO e o miRNA universal cloning linker (NEB). Foram usados três oligonucleótidos iniciadores para realizar o RT-PCR, o 3RTPO para a síntese da primeira cadeia de cDNA e os 3LPCRO e 5LPCRO para amplificar o cDNA gerado. Os sRNAs foram desfosforilados com a fosfatase CIP (NEB) a 37°C durante 30 minutos, seguida de uma extracção fenol/clorofórmio e ressuspensão em 20 µl de água (MP Biomedicals). Os sRNAs foram ligados ao adaptador 5' 5EAO. Foi efectuada uma transcrição reversa e seguidamente o produto da transcrição foi usado para PCR. Os fragmentos obtidos foram posteriormente digeridos e concatemerizados para poderem ser clonados, conforme descrito por Ramos *et al.* (2011a).

3.5. Clonagem do cDNA e triagem por PCR

Os “pools” de cDNA resultantes foram clonados no vector pCR II TOPO (Invitrogen) e usados para electrotransformar células de *E. coli* TOP 10F'. Os transformantes foram seleccionados em placas de LB suplementadas com 50 mg/l de canamicina e 40 mg/l de X-gal. As colónias brancas foram usadas para triagem por PCR em colónia. Os clones que originaram fragmentos de

amplificação entre 250 e 500 pares de bases com o par de oligonucleótidos M13 forward e M13 reverse (Tabela 3) foram seleccionados para análise por RFLP (Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição de DNA).

Tabela 3- Oligonucleótidos (Adaptado de Ramos *et al.*, 2011a)

| Oligonucleótido | Aplicação |
|-----------------|------------------------------------|
| 5EAO | adaptador 5' |
| miRNA | ligando de clonagem universal |
| 3RTPO | síntese da primeira cadeia de cDNA |
| 3LPCRO | síntese da segunda cadeia de cDNA |
| M13 Fwd e Rev | triagem dos clones por PCR |

3.6. RFLP e sequenciação

A análise dos clones por RFLP foi efectuada por digestão dos clones com a enzima de restrição Hae III, durante 30 minutos a 37°C, o que permitiu agrupar os clones por grupos com perfis de restrição semelhantes, como anteriormente descrito por Ramos *et al.* (2010b). As amostras digeridas foram observadas em géis de agarose a 0,8%. Um clone representativo de cada um dos perfis distintos foi sequenciado.

3.7. Sequenciação, mapeamento génico e modelação estrutural

As sequências nucleotídicas dos plasmídeos seleccionados foram obtidas por serviço contratado à Eurofins-MWG-Operon (Alemanha).

Várias ferramentas informáticas foram usadas para analisar sequências no intuito de investigar se correspondem ou não a possíveis sRNAs. As ferramentas bioinformáticas usadas são descritas seguidamente.

3.7.1. VecScreen

O VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) é uma ferramenta utilizada para identificar segmentos do vector de origem que

possam estar no DNA sequenciado. Esta análise permite a remoção de todos os segmentos do vector presentes da sequência pretendida, procurando todos os segmentos que coincidam com qualquer sequência numa base de dados, especializada e não-redundante, de vectores de clonagem (UniVec). Este teste preliminar foi efectuado a todas as sequências obtidas da sequenciação.

3.7.2. BLAST (NCBI)

O BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (National Center for Biotechnology information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) procura regiões com sequências semelhantes. O programa compara sequências nucleotídicas ou aminoacídicas semelhantes na sua base de dados e calcula a significância estatística dos resultados. O BLAST pode ser usado para deduzir relações funcionais e evolutivas entre sequências, como também ajudar a identificar membros de famílias de genes (Altschul *et al.*, 1997). Para obter informações sobre as sequências obtidas por sequenciação foi realizada uma pesquisa BLAST N (BLAST Nucleotide) a todas as sequências obtidas após análise pelo VecScreen. Com o intuito de filtrar a informação, a pesquisa foi limitada ao organismo em estudo *Burkholderia cenocepacia* J2315, para validar a veracidade das sequências e minimizar a introdução de erros.

3.7.3. Sistema IMG (Integrated Microbial Genomes)

O sistema IMG (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>) é uma base de dados que permite a análise comparativa e a anotação de todos os genomas disponíveis publicamente, incluindo plasmídeos e fagos.

A análise dos dados dos genomas microbianos no IMG normalmente começa com a definição dos parâmetros de análise em termos de selecção de genomas, anotações funcionais e/ou genes, seguidas de análise comparativa ou individual desses parâmetros.

3.7.4. Mapeamento dos sRNAs (sRNAMap)

A sRNAMap (<http://srnamap.mbc.nctu.edu.tw/>) é uma base de dados que compila genes que codificam sRNAs, os reguladores transcricionais dos sRNAs e os genes-alvo dos sRNAs. Adicionalmente, fornece outras informações como a estrutura secundária prevista, as condições e perfis de expressão de sRNAs, os locais de início da transcrição (TSS) e as ligações com outras bases de dados biológicas, muito úteis para investigações futuras (Huang *et al.*, 2009). Esta base de dados permite identificar sRNAs homólogos das sequências obtidas e fornece informações importantes sobre os possíveis sRNAs.

3.7.5. Previsão dos alvos

Os servidores sRNAtarget (<http://ccb.bmi.ac.cn/srna/prediction.php>) e TargetRNA (<http://snowwhite.wellesley.edu/targetRNA/>) foram usados para previsão dos possíveis alvos dos candidatos a sRNAs com conservação elevada entre espécies, estruturalmente conservados, com previsões de um promotor e terminador estatisticamente significativos.

3.7.6. Previsão de estrutura secundária

O Vienna RNA Package (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) faz a previsão e comparação de estruturas secundárias de RNA. A estrutura secundária é prevista através da estabilidade da estrutura (Energia mínima). São usados três tipos dinâmicos de algoritmos programados para previsão da estrutura: o algoritmo da energia mínima livre (Zucker & Stiegler, 1981) que obtém uma estrutura ótima, o algoritmo da função partição (McCaskill, 1990) que calcula as probabilidades de emparelhamento de bases no conjunto termodinâmico, e o algoritmo de enrolamento subótimo (Wuchty, *et al.*, 1999) que gera todas as estruturas subótimas dentro de um determinado intervalo de energia ótima. Para comparações estruturais, o pacote contém várias medidas de distância (Shapiro & Zhang, 1990). Por fim, é usado um algoritmo que desenha sequências com a estrutura predefinida.

3.7.7. Relações evolucionárias

Para comparar o alinhamento das sequências, usado para identificar regiões semelhantes que possam indicar relações funcionais e/ou evolucionárias entre duas sequências (proteínas ou ácidos nucleicos), é usada a ferramenta bioinformática Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>). Esta ferramenta permite alinhar sequências, identificar regiões idênticas, conservadas e semiconservadas, e estabelecer dendrogramas.

3.8. Construção de plasmídeos

Após a análise das sequências, fez-se uma selecção, para avançar apenas com sRNAs potencialmente interessantes e seguidamente efectuar a confirmação da sua expressão por Northern Blot. Para tal, as sequências foram ligadas ao vector pMLBAD, que contém uma cassette de resistência ao antibiótico trimetoprim (TP), sendo expressa após indução por arabinose. Foram ainda preparadas construções, que permitiam a sobreexpressão ou o silenciamento do sRNA em estudo.

3.9. Electrotransformação

Descongelaram-se duas alíquotas de 110 µl de suspensões celulares de *Burkholderia cenocepacia* J2315 electrocompetentes preparadas de acordo com Moreira *et al.* (2003). Juntaram-se às células 10 µl de solução do plasmídeo contendo a construção respeitante à sobreexpressão ou ao silenciamento e colocaram-se as misturas em cuvetes de electrotransformação, previamente arrefecidas a -20° C, evitando a formação de bolhas de ar. O equipamento de electrotransformação (Gene Pulse Apparatus BioRad) foi programado para uma resistência de 200 Ohms, capacitância de 25 µFD e voltagem de 2,5 kV e o pulso eléctrico foi aplicado. Após a electrotransformação, as suspensões celulares foram recuperadas da cuvette e adicionadas a 2 ml de meio LB, contido num tubo de ensaio estéril, deixando-se as células recuperar durante 4 horas. Posteriormente, 100 µl desta suspensão foram espalhados na superfície de meio PIA contendo 300 µg/ml do

antibiótico Trimetoprim e incubada durante a noite a 37°C e posteriormente guardada a 4°C.

3.10. Infecção do Nemátodo *Caenorhabditis elegans*

Os ensaios de morte e de colonização do sistema digestivo do nemátodo *Caenorhabditis elegans* foram efectuados usando a estirpe mutante DH26, de acordo com Sousa *et al.* (2010). O uso desta estirpe prende-se com a sua mutação sensível à temperatura, sendo os vermes estéreis a 25 °C, permitindo a sua contagem sem interferência da progenia. Os resultados obtidos são a média de três ensaios em que foram contabilizados os vermes sobreviventes às 12h, 24h, 36h, 48h e 72h e contabilizadas as unidades formadoras de colónias que colonizavam o tracto intestinal dos vermes, de acordo com os procedimentos descritos por Ramos *et al.* (2011b).

4. Resultados e Discussão:

Estudos recentes têm mostrado que os sRNAs desempenham um papel importante em vários processos bacterianos, entre os quais a regulação da expressão de factores de virulência em microrganismos patogénicos. A maior parte dos sRNAs descritos foram previstos bioinformaticamente. No entanto, a previsão bioinformática apresenta algumas lacunas pois não permite conhecer em que processos intervêm, a sua função biológica, ou mesmo se esses possíveis sRNAs são expressos.

Neste contexto, as estratégias baseadas em técnicas experimentais, como a descrita no presente estudo, apresentam algumas vantagens sobre as estratégias puramente bioinformáticas. Assim, no presente trabalho fez-se uso da conhecida interacção entre as chaperonas de RNA e os sRNAs, usando a proteína Hfq2 de *Burkholderia cenocepacia* J2315 para recolher sRNAs por co-purificação com esta proteína, seguida de purificação dos sRNAs, clonagem e sequenciação (Sousa *et al.* 2010; Ramos *et al.* 2011a).

Assim, o objectivo deste trabalho foi identificar e, se possível caracterizar novo(s) sRNA(s) de *Burkholderia cenocepacia* J2315 obtidos por co-purificação com a proteína Hfq2.

Após a co-purificação dos sRNAs com a Hfq2 recombinada, efectuou-se a síntese de cDNA. A clonagem dos fragmentos obtidos originou 98 clones.

Esses clones foram numerados por ordem crescente, sendo atribuído um número a cada um deles, para posteriormente se caracterizarem os seus perfis de restrição de maneira a seleccionar clones diferentes para sequenciar.

4.1. RFLP

Os 98 clones foram digeridos pela enzima de restrição HaeIII, tendo o seu perfil de restrição sido analisado. Os clones que apresentavam o mesmo perfil de restrição foram agrupados. Para catalogar os dezasseis perfis foi associado a cada um deles uma letra de A a P, como se exemplifica na Figura 2.

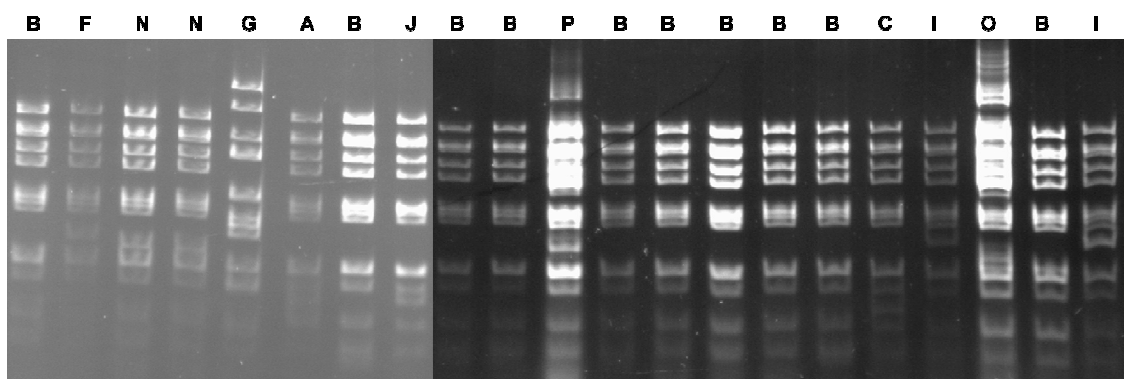


Figura 2- Perfis de RFLP obtidos, após restrição com a enzima HaeIII

A tabela 4, mostra as frequências relativas dos diferentes perfis de RFLP observados após a restrição com a enzima HaeIII.

Tabela 4- Polimorfismos observados após restrição com a enzima HaeIII.

| Perfil | Número de clones | Frequência relativa | Frequencia relativa em Percentagem (%) |
|--------|------------------|---------------------|--|
| A | 27 | 0,287 | 28,7 |
| B | 43 | 0,415 | 41,5 |
| C | 2 | 0,021 | 2,1 |
| D | 4 | 0,043 | 4,3 |
| E | 1 | 0,011 | 1,1 |
| F | 2 | 0,021 | 2,1 |
| G | 4 | 0,043 | 4,3 |
| H | 1 | 0,011 | 1,1 |
| I | 5 | 0,053 | 5,3 |
| J | 1 | 0,011 | 1,1 |
| K | 1 | 0,011 | 1,1 |
| L | 1 | 0,011 | 1,1 |
| M | 1 | 0,011 | 1,1 |
| N | 3 | 0,032 | 1,1 |
| O | 1 | 0,011 | 1,1 |
| P | 1 | 0,011 | 1,1 |

4.2. Sequenciação

As 16 amostras correspondentes a uma por cada perfil foram escolhidas aleatoriamente e enviadas para sequenciar como serviço contratado à Eurofins-MWG-Operon (Alemanha). As sequências de cDNA foram obtidas com uma abrangência de 100 % e uma confiança de 99,95%.

4.3. Análise Bioinformática

Cada um dos clones sequenciados foi sujeito a uma análise bioinformática detalhada. A análise informática apresentada corresponde a apenas um clone considerado de interesse para continuar a sua análise, após sequenciação e análise bioinformática.

A ferramenta bioinformática VecScreen permitiu concluir se a sequência resultante da sequenciação continha qualquer sequência do plasmídeo. Assim, esta ferramenta permitiu remover todas as contaminações com nucleótidos originários do vector de clonagem.

4.3.1. BLAST N e IMG

O BLAST N (Figura 3) e o IMG (Figura 4 A e B) permitiram identificar sequências homólogas aos presumíveis sRNAs no genoma de *Burkholderia cenocepacia* J2315 e localizar essas sequências no seu genoma. Ambas as bases de dados originaram resultados semelhantes, muito provavelmente por usarem o algoritmo BLAST na sua pesquisa.

Os dados obtidos serviram para avaliar as sequências e determinar a sua correspondência bem como a sua exacta localização no cromossoma. Tal pode servir nalguns casos como indicativos de função, pois podemos conhecer as proteínas codificadas nos genes da proximidade e no caso de uma sequência em *cis* a proteína codificada no gene da cadeia oposta ao da sequência dos sRNAs.

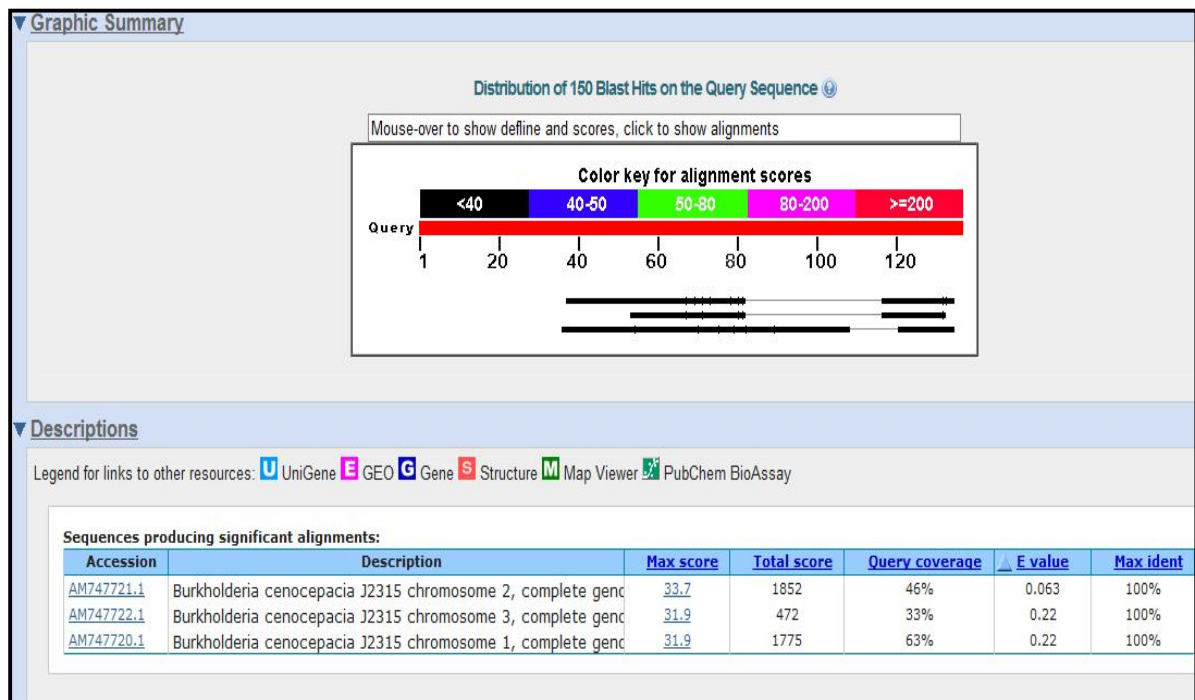


Figura 3- Informação recolhida pelo BLAST N do NCBI de uma das sequências obtidas.

Devido à concatemerização utilizada no procedimento experimental para obter a biblioteca de clones de cDNA e dificuldades derivadas da conversão do cDNA, algumas das informações presentes nas sequências nem sempre correspondem a uma sequência completa e válida. Por esta razão, apenas sequências com 100% de semelhança foram consideradas para análises posteriores. Esta análise não só permitiu controlar a qualidade das sequências obtidas, como também obter algumas informações sobre os possíveis sRNAs obtidos, nomeadamente o tamanho, a localização cromossômica, orientação da sequência, genes vizinhos e alguma informação sobre a possível função do sRNA.



Figura 4- Informação retirada do Blast do IMG da sequência escolhida. A- Sequências homólogas identificadas; B- Localização no genoma de *Burkholderia cenocepacia* J2315 de uma das sequências homólogas.

4.3.2. Identificação de sRNAs

As sequências obtidas foram introduzidas no servidor sRNAMap (Figura 5). Esta base de dados fornece informações relevantes sobre os possíveis sRNAs, como a previsão da sua estrutura secundária, as condições de expressão, os perfis de expressão e o TSS (local de início de transcrição) previsível dos sRNAs. Com esta ferramenta informática pretende-se identificar homólogos das nossas sequências de possíveis sRNAs (Figura 5B).

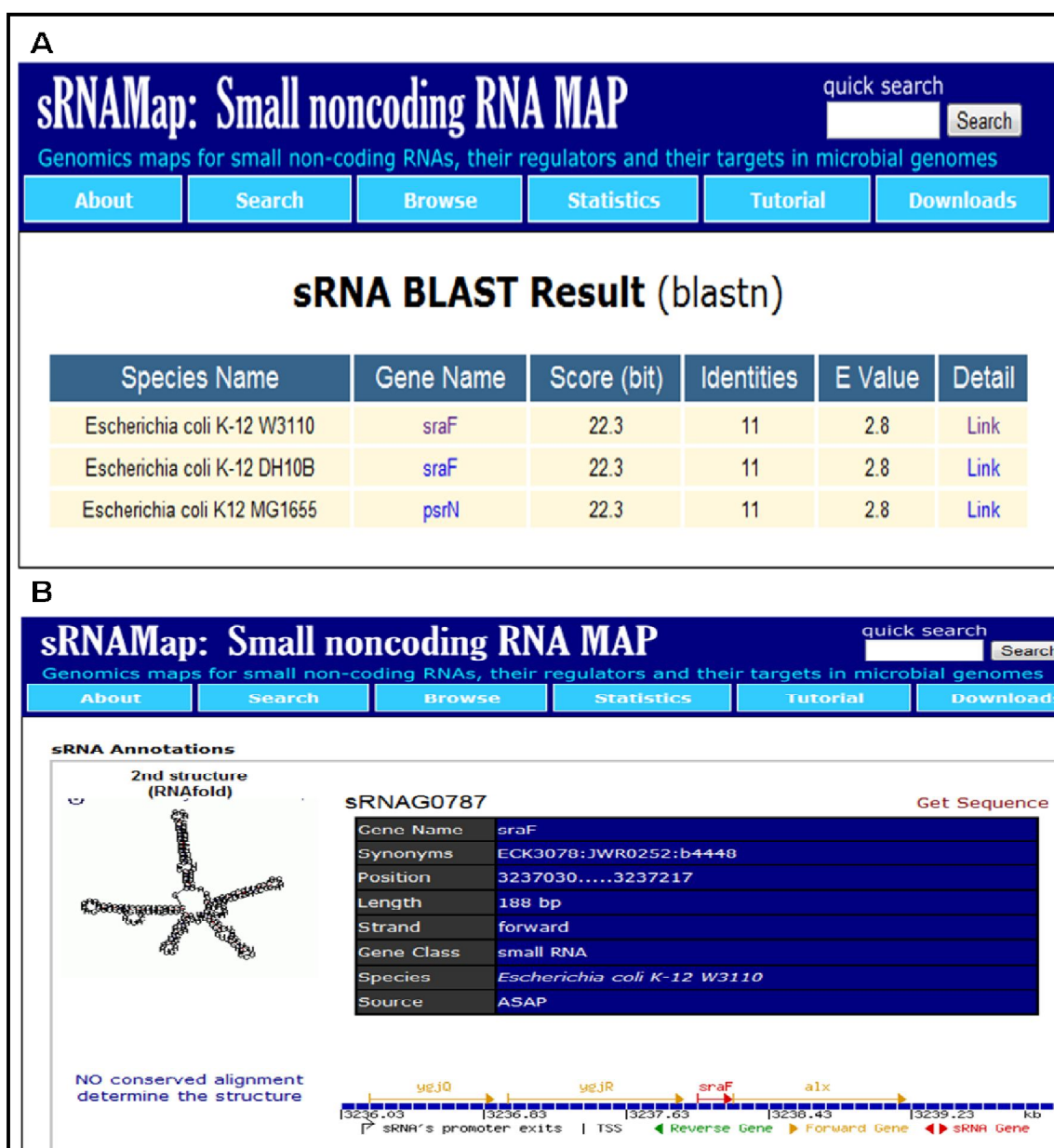


Figura 5- Página web do sRNAMap e um exemplo da informação sobre homólogos que se pode retirar a partir de uma sequência (B).

A maior parte da informação funcional dos sRNAs desta base de dados provém de estudos efectuados em *E. coli*, *Salmonella* e *Yersinia*, com algumas excepções. Por se encontrar em constante actualização os resultados provenientes desta base de dados podem variar por alterações da base de dados. Os dados utilizados neste trabalho reportam a actualizações feitas até Julho de 2011.

4.3.3. Previsão dos alvos dos sRNAs

A previsão dos alvos foi efectuada usando dois websites especializados nesta tarefa, o “TargetRNA” (Figura 6A) e o “sRNATarget” (Figura 6B). Ambos prevêem os possíveis mRNA alvo das sequências obtidas, mas como usam algoritmos diferentes, todas as sequências foram submetidas nos dois sites, com o objectivo de comparar os resultados obtidos e retirar o máximo de informação. Contudo, os dados obtidos através do “TargetRNA” são de interesse limitado dado que este website usa a informação do genoma de *Burkholderia multivorans* ATCC17616.

A



B



Figura 6- Servidores de internet usados para previsão de mRNA alvo, “TargetRNA” (A) e “sRNATarget” (B)

No caso do servidor sRNATarget, a informação é baseada no genoma de *Burkholderia cenocepacia* J2315, tendo-se imposto um e-value=1 (Figura 7). Após a análise dos resultados obtidos apenas um possível sRNA de *Burkholderia cenocepacia* J2315 foi escolhido para estudar no presente trabalho.

The screenshot shows the sRNATarget web server interface. At the top, it says "a web server for prediction of bacterial sRNA targets". The main navigation bar includes links for Home, Prediction, Publications, Help, Flash Tutorial, and Contact Us. The "Prediction" section is active, showing three steps for prediction. Step 1, "Choose bacterial genome", has a dropdown menu for "Genome" set to "Burkholderia cenocepacia J2315" and a text box for "NCBI CODE" set to "NC_011000". Step 2, "Choose sRNA or enter your sRNA sequence(s) in Fasta format", has a dropdown menu for "sRNA" set to "New sRNA sequence" and a large text box for "sRNA sequence (example sequence)". Step 3, "Set the score and enter your email", has a "Filter: show results with score >=" set to "1" and a "Notification via e-mail upon completion of the job (required)" field set to "your e-mail". A "Submit >>>" button is at the bottom.

Figura 7- Parâmetros utilizados para pesquisa mRNAs alvo no servidor “sRNATarget”.

O sRNA escolhido com base nos resultados obtidos pela análise bioinformática dos possíveis mRNA-alvos apresentados na Tabela 5 é constituído por 136 nucleótidos e foi denominado mtvR (“master virulence regulator”).

A escolha do mtvR deveu-se à presumível função que os seus possíveis alvos podem ter na virulência de *Burkholderia cenocepacia* J2315. Neste trabalho iremos focar-nos mais na sua relação com a chaperona de RNA, Hfq2, que como foi observado anteriormente, desempenha um papel na virulência do Bcc (Ramos *et al.*, 2011).

Outros mRNAs-alvos serão objecto posterior de estudo, na tentativa de os confirmar e caracterizar se possível. É de referir que ao analisar os possíveis alvos do mtvR, estes parecem ter um papel importante no metabolismo celular e/ou resposta a stresses (*rpoN*), transporte activo de antibióticos (*GntR*, *AnsC*), na mobilidade bacteriana (*flgH*, *fliO*) e na regulação transcricional (*gcvR*).

Tabela 5- Potenciais mRNAs-alvos do sRNA mtvR de *Burkholderia cenocepacia* J2315.

| Gene | Função | Locus |
|---------------------|--|----------|
| <i>hfq</i> | Chaperona de RNA e Regulador Pleiotrópico | BCAL1879 |
| <i>recQ</i> | Helicase RecQ dependente de ATP | BCAL0228 |
| <i>rpoN</i> | Regulador transcrição em resposta a limitação de azoto | BCAL0813 |
| <i>rpsL</i> | Subunidade ribossomal envolvida na precisão da tradução. Importante para a estrutura ribossômica | BCAL0229 |
| <i>flgH</i> | Precursora da proteína flagelar L-ring protege o corpo basal das forças de corte durante a rotação | BCAL0570 |
| <i>rhIE2</i> | Helicase de RNA dependente de ATP | BCAL2412 |
| <i>fliO</i> | Componente essencial da proteína específica do flagelo | BCAL3504 |
| <i>gcvR</i> | <i>gcvA</i> da família de reguladores transcricionais LysR | BCAL0382 |
| <i>GntR</i> | Regulador de transportes de aglomerados (Fe-S), tipo MFS | BCAL2048 |
| <i>GntR</i> | Regulador de transporte de aglomerados, tipo ABC | BCAL0444 |
| <i>ptsR</i> | Regulador PTS | BCAL0777 |
| <i>AnsC</i> | Regulador de transportadores de aglomerados ABC | BCAL1089 |

4.3.4. Previsão da estrutura secundária dos sRNAs

A sequência do mtvR foi analisada relativamente à sua conservação estrutural usando o Vienna RNA Package, versão 2.0 (2010).

Estas ferramentas foram usadas para detectar estruturas secundárias estáveis termodinamicamente e conservadas evolutivamente, nomeadamente a ferramenta de análise da conservação estrutural RNAfold, que prevê as estruturas secundárias com menor energia mínima e probabilidades de emparelhamento de bases das sequências, e RNAalifold que prevê a estrutura consenso das sequências. A previsão de estrutura secundária para o mtvR pode ser observada na Figura 8.

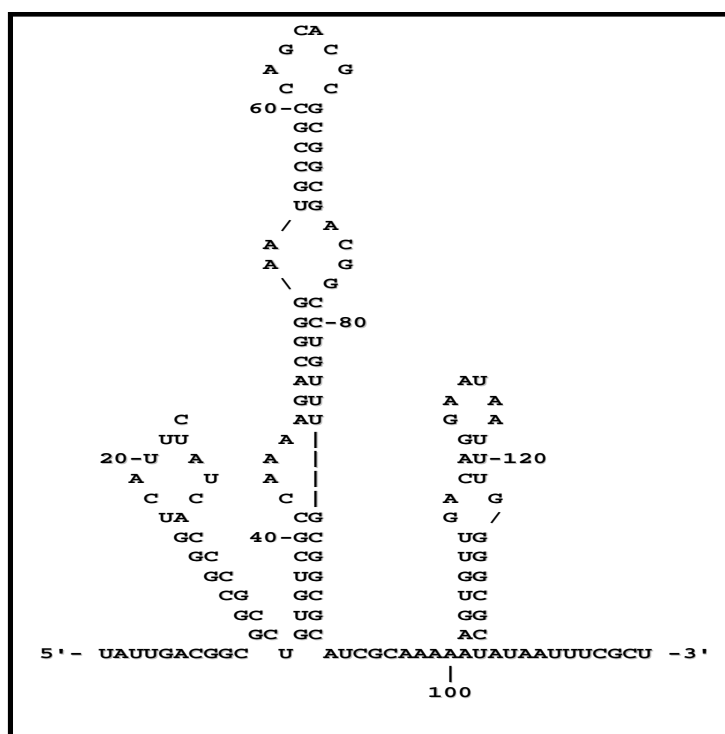


Figura 8- Estrutura secundária prevista para o mtvR após análise bioinformática da sua sequência usando a ferramenta bioinformática RNAalifold.

4.3.5. Ensaios de virulência

Como um dos objectivos deste trabalho era identificar e caracterizar o papel de sRNAs na virulência de *Burkholderia cenocepacia* J2315, fizeram-se ensaios de virulência com três diferentes níveis de expressão do sRNA mtvR. Usou-se a estirpe selvagem *Burkholderia cenocepacia* J2315 (wt) como controlo para estes testes, fazendo variar o nível de expressão do mtvR nessa mesma estirpe microbiana, com plasmídeos induzíveis por arabinose, os quais foram denominados de “sense mtvR” (+mtvR) e “antisense mtvR” (-mtvR), responsáveis respectivamente pela sobreexpressão e silenciamento do mtvR.

Nestes testes de virulência, foi usado o modelo de infecção *Caenorhabditis elegans* DH26, tendo sido analisados dois indicadores de virulência, a taxa de sobrevivência e capacidade das estirpes para colonizar o tracto intestinal do nemátodo (Figuras 9 e 10).

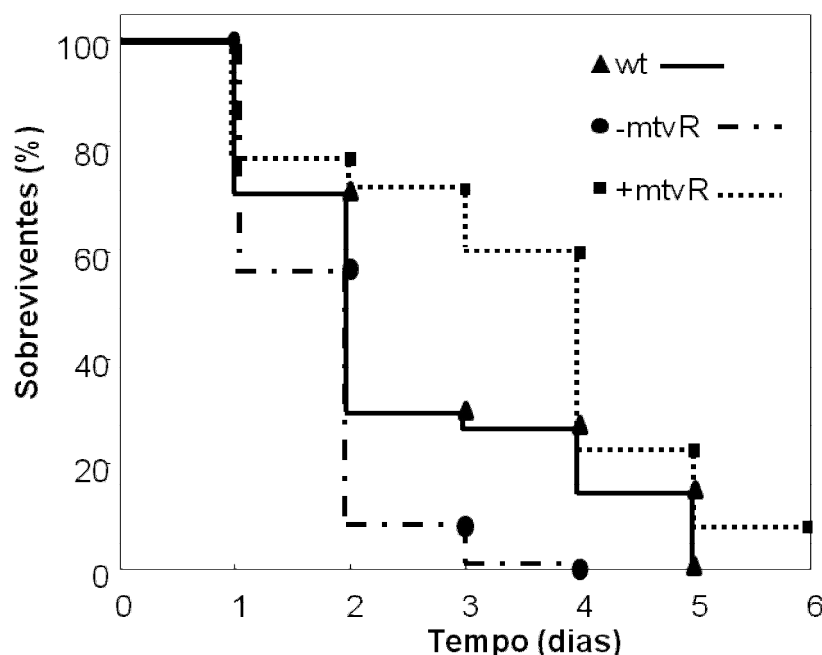


Figura 9- Taxa de sobrevivência de *C. elegans* à infecção por *B. cenocepacia* J2315 (wt), *B. cenocepacia* J2315 sobreexpressando o mtvR (+mtvR) e *B. cenocepacia* J2315 com o mtvR silenciado (-mtvR).

Como se verifica pelos resultados da Figura 9, a variação da expressão do sRNA mtvR afecta significativamente a virulência de *Burkholderia cenocepacia* J2315. É de salientar o facto de ser precisamente a estirpe em que se induziu o silenciamento do sRNA mtvR (-mtvR) a que apresentou uma maior virulência, apresentando a estirpe que sobreexpressa o mtvR (+mtvR) uma menor virulência pois ao fim de 6 dias de infecção ainda se observaram nemátodos sobreviventes. Este facto é curioso uma vez que sendo necessário para a regulação celular, o aumento da sua expressão conduz a uma diminuição da virulência em *C. elegans*, enquanto o seu silenciamento acelera a taxa de morte do nemátodo.

Outro facto interessante é que ao contrário do que seria de esperar, face aos resultados das taxas de sobrevivência, os *C. elegans* infectados com a estirpe com o mtvR silenciado (-mtvR) apresentam uma menor colonização do tracto digestivo do nemátodo, que a estirpe selvagem e que a estirpe em que se induziu a sobreexpressão do mtvR (+mtvR), que não apresentam variação estatisticamente relevante entre elas, como se pode observar na Figura 10.

Estes resultados indiciam que o sRNA *mtvR* é crucial no estabelecimento da infecção e colonização do intestino do modelo *C. elegans*, embora o seu silenciamento conduza a uma infecção mais agressiva.

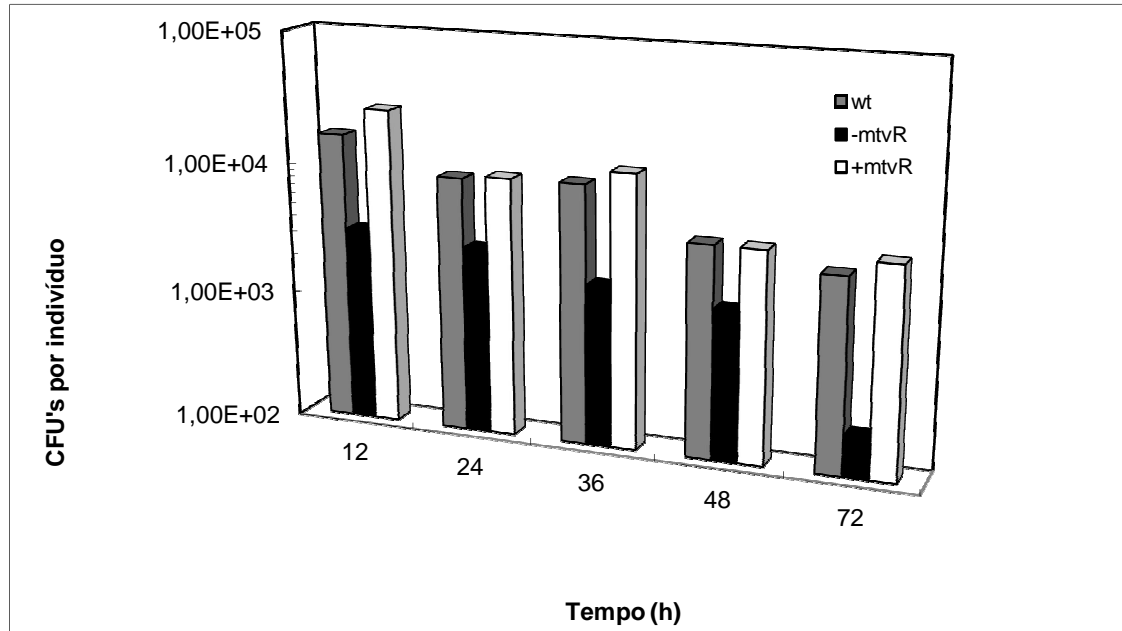


Figura 10- Total de bactérias expressando diferentes níveis de *mtvR*, colonizadoras do tracto intestinal de *C. elegans*.

5. Discussão Final

Existe actualmente um reconhecimento crescente do papel dos sRNAs como determinantes na regulação de factores de virulência em vários patogéneos bacterianos. Em 2007, Coenye *et al.* identificaram 213 prováveis sRNAs na estirpe *B. cenocepacia* J2315, contudo apenas para quatro foi confirmada a sua expressão, permanecendo desconhecidas as suas funções biológicas.

A escolha da estratégia experimental utilizada neste trabalho para identificar sRNAs baseou-se na capacidade das chaperonas de RNA (Hfq e Hfq2) para se ligarem a sRNAs. Tal permitiu isolar sRNAs de *B. cenocepacia* J2315 por co-purificação (CP) com a proteína recentemente descoberta e caracterizada, Hfq2. Após a extracção dos presumíveis sRNAs, estes foram convertidos em cDNA, que foi ligado a um vector de clonagem, o que permitiu a sua posterior sequenciação.

Dos 98 clones obtidos foram seleccionados 16 para sequenciação por possuírem perfis de RFLP distintos. Uma nota importante é que a maior parte do conhecimento em sRNAs provém de estudos em *E. coli*, *Salmonella* ou *Pseudomonas*. Vários estudos têm demonstrado a existência de genes conservados que são regulados por sRNAs similares, apesar de diferirem em tamanho e na sequência exacta, mesmo dentro do mesmo género bacteriano.

O uso de várias ferramentas bioinformáticas permitiu retirar algumas informações importantes das sequências analisadas. Essas informações permitiram entre outras, elaborar uma tabela com os possíveis genes-alvo da regulação pelo sRNA mtvR de *B. cenocepacia* J2315. Foi escolhido o sRNA mtvR, pois com base nos seus alvos previstos antevia-se que pudesse desempenhar um papel na virulência de *B. cenocepacia*. Essa antevisão foi feita por análise das funções dos genes previstos como alvo, genes esses envolvidos na mobilidade bacteriana, no metabolismo celular, resposta a stresses, regulação da transcrição e transporte activo de antibióticos. Porém, a nossa escolha ficou a dever-se em primazia pela previsão de regulação da chaperona de RNA Hfq, uma proteína já caracterizada como estando estreitamente ligada à virulência de bactérias do Bcc (Sousa *et al.*, 2010).

Como as conjecturas baseadas em análises bioinformáticas requerem validação por métodos experimentais, efectuaram-se testes de virulência no modelo de infecção *C. elegans*. Observaram-se de facto alterações de virulência consoante o nível de expressão do sRNA mtvR, comprovando o seu papel na virulência.

Apesar de necessitarem de validação, estas análises informáticas são um guia precioso na orientação do trabalho experimental, direccionando-o através das indicações que são obtidas *in silico* e que constituem o ponto de partida para a elucidação de mecanismos de regulação génica, neste caso concreto da regulação da virulência das bactérias do Bcc, mais especificamente de *B. cenocepacia* J2315.

Os resultados obtidos apontam para o sRNA mtvR como um factor de regulação da virulência em *B. cenocepacia* J2315, pelo que o seu estudo mais aprofundado deve prosseguir para averiguar quais são concretamente os mecanismos em que está envolvido. Os restantes alvos apontados pela análise bioinformática deverão constituir também futuramente objecto de estudo pois a resposta a stresses, a resistência a antibióticos e a mobilidade bacteriana são considerados factores essenciais no estabelecimento, desenvolvimento e manutenção das infecções por bactérias do Bcc. É ainda de referir que não foi encontrado nas bases de dados qualquer homólogo ao mtvR, o que sugere que se trate de um sRNA específico do género *Burkholderia*.

6. Conclusão e Perspectivas Futuras

Os sRNAs têm vindo a ser reconhecidos como importantes reguladores da virulência bacteriana, estando muitas vezes associados a uma chaperona de RNA como é o caso das proteínas Hfq e Hfq2 de *Burkholderia cenocepacia* J2315.

Têm vindo a ser efectuados estudos computacionais à escala genómica para prever a existência de sRNAs em genomas bacterianos. Esta estratégia tem vantagens como a capacidade para em pouco tempo gerar grandes quantidades de informação. Contudo tem uma grande desvantagem pois gera um grande número de sequências de RNA que precisam de ser clonadas e validadas, para além da análise bioinformática dessas sequências ser trabalhosa.

Um dos principais inconvenientes da estratégia adoptada no presente trabalho é o facto de alguns sRNAs só serem expressos em certas circunstâncias, como em resposta a stresses específicos e durante um curto período de tempo, levando a que seja quase impossível identificá-los, tanto nesta estratégia como na maioria das estratégias experimentais.

A estratégia utilizada neste trabalho não gera um elevado número de sequências de RNA, sendo uma das principais vantagens desta metodologia, pois limita o número de sequenciações necessárias. Esta limitação é contrabalançada pelo facto dos clones de cDNA correspondentes aos sRNAs isolados poderem ser usados directamente como sondas na análise da transcrição em estudos posteriores, ou em trabalhos que envolvam a sua re-clonagem.

O aumento do conhecimento sobre os sRNAs tem aberto portas para o conhecimento da regulação génica, permitindo idealizar novas terapias para problemas que hoje em dia são dificilmente solucionáveis, como é o caso das infecções com bactérias patogénicas multirresistentes a antibióticos. Estas possíveis novas terapias deverão basear-se em estratégias de silenciamento de genes-alvo bacterianos relevantes para a virulência ou para processos vitais à célula.

As sequências externas guia, conhecidas como EGSs, têm sido usadas com sucesso na inibição da expressão a nível pós-transcricional de genes alvo, tanto em eucariotas como em procariotas (Forster & Altman, 1990).

O princípio da actuação dos EGSs consiste na degradação pela Ribonuclease P (RNase P) dum complexo formado entre o sRNA produzido *in vivo*, neste caso por *E. coli*, e o EGS que para além de conter uma sequência complementar ao sRNA, contém uma sequência CCA na extremidade 3' que é reconhecida pela RNase P assegurando a degradação (Forster & Altman, 1990).

Vários testes com EGSs têm sido feitos apresentando bons resultados. Um exemplo do sucesso desta técnica foi realizado por Guerrier-Takada *et al.* (1997) em que plasmídeos contendo EGSs, foram introduzidos em estirpes bacterianas com genes de resistência a antibióticos, tendo como alvo o mRNA desses genes, convertendo as estirpes resistentes a drogas em estirpes susceptíveis a essas mesmas drogas. Tendo sido observado também que o aumento do rácio EGS-mRNA alvo aumenta a eficiência do processo de degradação (Guerrier-Takada *et al.*, 1997).

Para além dos EGSs existem outras moléculas capazes de inibir a tradução de determinado mRNA por um mecanismo antisense, os oligómeros de fosforodiamida-morfolino, conhecidos por PMOs. Estes apresentam a limitação de terem que permeiar a parede bacteriana. Para aumentar a eficácia dos PMOs, estes têm sido usados conjuntamente com derivados peptídicos aumentando a sua permeabilidade membranar (Tilley *et al.*, 2007).

A identificação e caracterização de sRNAs envolvidos na virulência bacteriana, como é o caso do *mtvR* de *Burkholderia cenocepacia* J2315, combinado com as tecnologias de EGS e PMO, apresentam-se assim como futuras alternativas no combate às bactérias patogénicas multirresistentes.

7. Bibliografia

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25** :3389-3402.

Altuvia, S., Identification of bacterial small non-coding RNAs: experimental approaches. *Current Opinion in Microbiology*, 2007, **10**: 257-261.

Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Drevinek, P., Pope, C., Waine, D.J., Henry, D.A., Speert, D.P., Carter, P., Vandamme, P., LiPuma, J.J. & Dowson, C.G., Elucidating global epidemiology of *Burkholderia multivorans* in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, **46**: 290–295.

Boucher, R.C., Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. *J. Intern. Med.*, 2007, **261**: 5–16

Brown, L. & Elliott, T., Efficient translation of the RpoS sigma factor in *Salmonella typhimurium* requires host factor I, an RNA-binding protein encoded by the *hfq* gene. *J. Bacteriol.*, 1996, **178**: 3763–3770.

Burkholder, W., Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathol.*, 1950, **64**: 468–475.

Caraher, E., Reynolds, G., Murphy, P., McClean, S. & Callaghan, M., Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm *in vitro*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2007, **26**: 213–216.

Chao, Y. & Vogel, J., The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2010, **13**: 24-33.

Coenye, T., Drevinek, P., Mahenthiralingam, E., Shah, S.A., Gill, R.T., Vandamme, P. & Ussery, D.W., Identification of putative noncoding RNA genes in the *Burkholderia cenocepacia* J2315 genome. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, **276**: 83-92.

Cunha, M. V., Pinto-de-Oliveira, A., Meirinhos-Soares, L., Salgado, M. J., Melo-Cristino, J., Correia, S., Barreto, C. & Sá -Correia, I., Exceptionally high representation of *Burkholderia cepacia* among *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from the major Portuguese cystic fibrosis center. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, **45**: 1628–1633.

Cunha, M.V., Leitão, J.H., Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Lito, L., Barreto, C., Salgado, M.J. & Sá-Correia, I., Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a Portuguese cystic fibrosis center: a 7-year study. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, **41**: 4113–4120.

Drevinek, P. & Mahenthiralingam, E., *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010, **16**: 821–830.

Fantappiè, L., Metruccio, M.M., Seib, K.L., Oriente, F., Cartocci, E., Ferlicca, F., Giuliani, M.M.M., Scarlato, V. & Delany, I., The RNA chaperone Hfq is involved in stress response and virulence in *Neisseria meningitidis* and is a pleiotropic regulator of protein expression. *Infect. Immun.*, 2009, **77**: 1842–1853.

Forster, A.C. & Altman, S., External guide sequences for an RNA enzyme. *Science*, 1990. **249**: 783-786.

Fuqua, C., Winans, S.C. & Greenberg, E.P., Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1996, **50**: 727–751.

Franze de Fernandez, M.T., Eoyang, L. & August, J.T., Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Q β -RNA. *Nature*, 1968, **219**: 588–590.

George, A.M., Jones, P.M., & Middleton, P.G., Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, vol. 300, **2**: 153–164.

Gottesman, S., Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends in Genet.*, 2005, vol. 21, **7**: 399-404.

Gottesman, S. & Storz G., Bacterial Small RNA Regulators: Versatile Roles and Rapidly Evolving Variations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2010.

Govan, J.R., Brown, A.R. & Jones, A.M., Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol.*, 2007, **2**: 153–164.

Govan, J.R. & Deretic, V., Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.*, 1996, **60**: 539–574.

Guerrier-Takada, C., Salavati, R. & Altman, S., Phenotypic conversion of drug-resistant bacteria to drug sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, **94**: 8468-8472.

Holden, M.T., Seth-Smith, H.M., Crossman, L.C., Sebaihia, M., Bentley, S.D., Cerdeno-Tarraga, A.M., Thomson, N.R., Bason, N., Quail, M.A., Sharp, S., Cherevach, I., Churcher, C., Goodhead, I., Hauser, H., Holroyd, N., Mungall, K., Scott, P., Walker, D., White, B., Rose, H., Iversen, P., Mil-Homens, D., Rocha, E.P., Fialho, A.M., Baldwin, A., Dowson, C., Barrell, B.G., Govan, J.R., Vandamme, P., Hart, C.A., Mahenthiralingam, E. & Parkhill, J., The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J. Bacteriol.*, 2009, **191**: 261–277.

Huang, H.Y., Chang, H.Y., Chou, C.H., Tseng, C.P., Ho, S.Y., Yang, C.D., Ju, Y.W., & Huang, H.D., sRNAMap: genomic maps for small non-coding RNAs, their regulators and their targets in microbial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 2009, **37**: 150-154.

Isles, A., Maclusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P. & Levison, H., *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J. Pediatr.*, 1984, **104**: 206–210.

Kawano, M., Reynolds, A.A., Miranda-Rios, J. & Storz, G., Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**: 1040-1050.

Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. & Bartel, D.P., An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, **294**: 858-862.

Leitão, J.H., Sousa, S.A., Cunha, M.V., Salgado, M.J., Melo-Cristino, J., Barreto, M.C. & Sá-Correia, I., Variation of the antimicrobial susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex clonal isolates obtained from chronically infected cystic fibrosis patients: a five year survey in the major Portuguese treatment center. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2008, **27**: 1101-1111.

Leitão, J.H., Sousa, S.A., Ferreira, A.S., Ramos, C.G., Silva, I.N. & Moreira, L.M., Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **87**: 31-40.

LiPuma, J.J., Spilker, T., Gill, L.H., Campbell III, P.W., Liu, L. & Mahenthiralingam, E., Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, **164**: 92–96.

Loulet, S.A. & Valvano, M.A., A decade of *Burkholderia cenocepacia* virulence determinant research. *Infect. Immun.*, 2010, vol. 78, **10**: 4088-4100

Lyczak, J.B., Cannon, L.C. & Pier, G.P., Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, **15**: 194–222.

Mahenthiralingam, E., Urban, T.A. & Goldberg, J.B., The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, **3**: 144–156.

Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Campbell, M.E., Henry, D.A., Gravelle, A.M., Wong, L.T., Davidson, A.G., Wilcox, P.G., Nakielna, B. & Speert, D.P., Infection with *Burkholderia cepacia* Complex Genomovars in Patients with Cystic Fibrosis: Virulent Transmissible Strains of Genomovar III Can Replace *Burkholderia multivorans*. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, **33**: 1469–1475.

Man, S., Cheng, R., Miao, C., Gong, Q., Gu, Y., Lu, X., Han, F., & Yu, W., Artificial trans-encoded small non-coding RNAs specifically silence the selected gene expression in bacteria. *Nucleic Acids Res.*, 2011, 1–16.

McCaskill, J.S. The equilibrium partition function and base pair binding probabilities for RNA secondary structures. *Biopolymers*, 1990, **29**: 1105-1119.

Moreira, L.M., Videira, P.A., Sousa, S.A., Leitão, J.H., Cunha, M.V. & Sá-Correia, Identification and physical organization of the gene cluster involved in the biosynthesis of *Burkholderia cepacia* complex exopolysaccharide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, vol. 312, **2**: 323–333.

Muffler, A., Fischer, D. & Hengge-Aronis, R., The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, 1996, **10**: 1143–1151.

Nakao, H., Watanabe, H., Nakayama, S. & Takeda, T., *yst* gene expression in *Yersinia enterocolitica* is positively regulated by a chromosomal region that is highly homologous to *Escherichia coli* host factor 1 gene (*hfq*). *Mol. Microbiol.*, 1995, **18**: 859–865.

Papenfort, K. & Vogel, J., Multiple target regulation by small noncoding RNAs rewires gene expression at the post-transcriptional level. *Res. Microbiol.*, 2009, **160**: 278-287.

Papenfort, K. & Vogel, J., Regulatory RNA in Bacterial Pathogens. *Cell Host Microbe*, 2010, **8**: 116-127.

Peeters, E., Sass, A., Mahenthiralingam, E., Nelis, H. & Coenye, T., Transcriptional response of *Burkholderia cenocepacia* J2315 sessile cells to treatments with high doses of hydrogen peroxide and sodium hypochlorite. *BMC Genomics*, 2010, **10**: 90

Rajkowitsch, L. & Schroeder, R., Coupling RNA annealing and strand displacement: a FRET-based microplate reader assay for RNA chaperone activity. *BioTechniques*, 2007, **43**: 304-310.

Rajkowitsch, L. & Schroeder, R., Dissecting RNA chaperone activity. *RNA*, 2007, **13**: 2053–2060.

Ramos, C.G., Grilo, A.M. & Leitão, J.H., Small non-coding RNAs in Prokaryotes: Roles in Pathogenesis and Potential Therapeutic Targets. 2010a, Saarbrücken, Germany: Lambert Academic Publishing. 75.

Ramos, C.G., Grilo, A.M., Sousa, S.A., Barbosa, M.L., Nadais, H. & Leitão, J.H., A new methodology combining PCR, cloning, and sequencing of clones discriminated by

RFLP for the study of microbial populations: application to an UASB reactor sample. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010b, **85**: 801-806.

Ramos, C.G., Sousa, S.A., Grilo, A.M., Da Costa, P.J.P., Feliciano, J.R. & Leitão, J.H., A RNomics-based strategy identifies regulatory small RNAs in *Burkholderia cepacia* complex. 1st Portuguese Meeting in Bioengineering - Meeting Proceedings (IEEE Portuguese Engineering in Medicine and Biology Society, March 2011), 2011a: 92-95.

Ramos, C.G., Sousa, S.A., Grilo, A.M., Feliciano, J.R. & Leitão, J.H., The second RNA chaperone, Hfq2, is also required for survival under stress and full virulence of *Burkholderia cenocepacia* J2315. *Journal of Bacteriology*, 2011b, vol. 193, **7**: 1515-1526.

Ratjen, F. & Döring, G., Cystic fibrosis. *Lancet*, 2003, vol. 361, **9358**: 681–689.

Repoila, F., Majdalani, N. & Gottesman, S., Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: The RpoS paradigm. *Mol. Microbiol.*, 2003, **48**: 855–861.

Robertson, G.T. & Roop, R.M., Jr, The *Brucella abortus* host factor 1 (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol. Microbiol.*, 1999, **34**: 690–700.

Salgado-Garrido, J., Bragado-Nilsson, E., Kandels-Lewis, S., & Séraphin, B., Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *EMBO J.*, 1999, **18**: 3451–3462.

Sauter, C., Basquin, J. & Suck, D., Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, 2003. **31**: 4091–4098.

Shapiro, B.A. & Zhang, K., Comparing multiple RNA secondary structures using tree comparison. *Cabios*, 1990, **6**: 309-318.

Sharma, C.M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiß, S., Sittka, A., Chabas, S., Reiche, K., Hackermüller, J., Reinhardt, R., Stadler, P. F. & Vofel, J., The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 2010, 464.

Sittka, A., Pfeiffer, V., Tedin, K. & Vogel, J., The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.*, 2007, **63**: 193–217.

Sledjeski, D.D., Whitman, C. & Zhang, A., Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA. *J. Bacteriol.*, 2001, **183**: 1997–2005.

Soper, T., Mandin, P., Majdalani, N., Gottesman, S. & Woodson, S.A., Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq, *PNAS*, 2010, vol. 107, **2**: 9602-9607.

Sonnleitner, E., Hagens, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Habel, A., Jager, K. E. & Blasi, U., Reduced virulence of a *hfq* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb. Pathog.*, 2003, **35**: 217–228.

Sousa, S.A., Ramos, C.G. & Leitão, J.H., *Burkholderia cepacia* complex: emerging multi-host pathogens equipped with a wide range of virulence factors and determinants. *Int. J. Microbiol.*, 2011, doi: [10.1155/2011/607575](https://doi.org/10.1155/2011/607575).

Sousa, S.A., Ramos, C.G., Moreira, L.M. & Leitão, J.H., The *hfq* gene is required for stress resistance and full virulence of *Burkholderia cepacia* to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Microbiology*, 2010, **156**: 896-908.

Tilley, L.D., Mellbye, B.L., Puckett, S.E., Iversen, P.L., & Geller, B.L., Antisense peptide-phosphorodiamidate morpholino oligomer conjugate: doseresponse in mice infected with *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, **59**: 66-73.

Tsui, H.C., Leung, H.C. & Winkler, M.E., Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.*, 1994, **13**: 35–49.

Uehlinger, S., Schwager, S., Bernier, S.P., Riedel, K., Nguyen, D.T., Sokol, P.A. & Eberl, L. Identification of specific and universal virulence factors in *Burkholderia cenocepacia* strains by using multiple infection hosts. *Infect. Immun.*, 2009, **77**: 4102–4110

Valentin-Hansen, P., Eriksen, M. & Udesen, C., The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol. Microbiol.*, 2004, **51**: 1525–1533.

Vanlaere, E., Baldwin, A., Gevers, D., Henry, D., De Brandt, E., LiPuma, J.J., Mahenthiralingam, E., Speert, D.P., Dowson, C. & Vandamme, P. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex comprises at least two novel species: *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, **59**: 102–111.

Vanlaere, E., Lipuma, J.J., Baldwin, A., Henry, D., De Brandt, E., Mahenthiralingam, E., Speert, D.P., Dowson, C. & Vandamme, P., *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2008, **58**: 1580–1590.

Venturi, V., Friscina, A., Bertani, I., Devescovi, G. & Aguilar, C., Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. *Res. Microbiol.*, 2004, **155**: 238–244

Waters, L. S. & Storz G., Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*, 2009, **136**: 615- 628.

Wuchty, S., Fontana, W., Hofacker, I.L., & Schuster, P., Complete suboptimal folding of RNA and the stability of secondary structures. *Biopolymers*, 1999. **49**:145–165.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. & Arakawa, M., Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Pseudomonas cepacia* (Palleroni & Holmes, 1981) comb. nov., *Microbiol. Immunol.*, 1992, **36**: 1251–1275.

Zuker, M. & Stiegler, P., Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamic and auxiliary information, *Nucleic Acid Res.*, 1981, **9**: 133-148.)